

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭58—96052

⑤ Int. Cl.³
C 07 C 103/52
102/00
// A 61 K 37/24

識別記号
1 0 7

庁内整理番号
7375—4H
7375—4H
7138—4C

⑬ 公開 昭和58年(1983)6月7日

発明の数 1
審査請求 未請求

Toyo Soda

(全 20 頁)

⑭ 高活性 h-PTH (1-34) アミドの製造法

京都市左京区一乗寺川原田町44

⑮ 出 願 人 東洋醸造株式会社

静岡県田方郡大仁町三福632の

1

⑯ 特 願 昭56—193212

⑰ 出 願 昭56(1981)11月30日

⑱ 発 明 者 船越奨

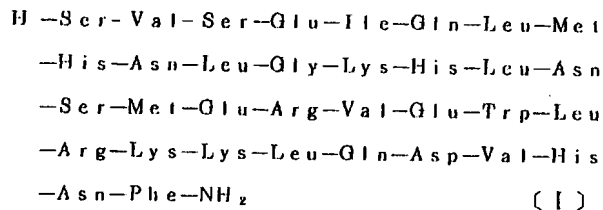
明 細 書

1. 発明の名称

高活性 h-PTH (1-34) アミドの製造法

2. 特許請求の範囲

(1) 式

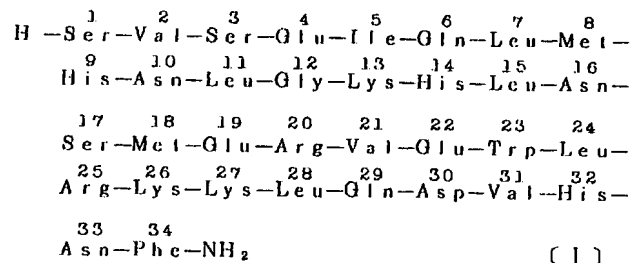


で表わされる h-PTH (1-34) アミドまたはその塩を製造するに当り、C末端フェニルアラニル基のカルボキシル基をアミド基に転化し、式(I)のアミノ酸順序に個々の保護されたアミノ酸および(または)保護されたペプチドを液相合成法により縮合し、縮合反応の最終段階でN末端のアミノ基の保護基および側鎖の官能基の保護基を酸分解により脱離し、得られた h-PTH (1-34) アミドをゲル濾過剤および吸着剤を用いるカラムクロマトグラフィーにより分離精製することの特徴

とする高活性 h-PTH (1-34) アミドの製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、ヒト副甲状腺ホルモン (h-PTH) (1-34) アミドの製造法に関する。さらに詳しくは、本発明は、式



で表わされるペプチドまたはその塩を製造するに当り、C末端フェニルアラニル基のカルボキシル基をアミド基に転化し、式(I)のアミノ酸順序に個々の保護されたアミノ酸および(または)保護された低級ペプチドを液相合成法により縮合し、縮合反応の最終段階でN末端のアミノ基の保護基および側鎖の官能基の保護基を酸分解により脱離し、得られた h-PTH (1-34) アミドをゲル濾過剤および吸着剤を用いるカラムクロマトグラフ

イーにより分離精製することを特徴とする高活性 h-PTH(1-34)アミドの製造法である。

式〔I〕で表わされる h-PTH(1-34)アミドは、元の h-PTH(1-34)より 1.5 ~ 2 倍の h-PTH 活性を有し、しかもこれを抗原として得られる抗体は h-PTH と免疫交叉活性を有する。このため、本ペプチドは副甲状腺機能低下症治療剤および副甲状腺機能検査のための抗体調製用ペプチドとして有用である。

本発明のペプチド〔I〕は、C末端フェニルアラニル基のカルボキシ基をアミド基に転化し、式〔I〕で示されるアミノ酸順序に個々の保護されたアミノ酸および（または）保護された低級ペプチドを液相合成法により縮合し、縮合反応の最終段階で N 末端のアミノ基の保護基および側鎖の官能基の保護基を酸分解により脱離することにより得られる。縮合反応自体はペプチド合成のための常法手段に従つて、保護基の着脱、縮合反応を繰り返すことにより行われる。即ち、本ペプチド〔I〕の原料ならびにすべての中間体の製造にお

- 8 -

トリル-イソプロポキシカルボニル基、2-p-ジフェニル-イソプロポキシカルボニル基などのアラルキルオキシカルボニル基などがある。またこれらアミノ基をベンゾイルアセトン、アセチルアセトンなどの 1, 8-ジクトンと反応させることによつて得られるエナミンの形成により保護することができる。

カルボキシ基は、アミド形成、ヒドラチド形成またはエステル化によつて保護される。即ちアミド基は、3, 4-ジメトキシベンジル基、ビス-（p-メトキシフェニル）メチル基などによつて置換される。ヒドラチド基はベンジルオキシカルボニル基、トリクロロエチルオキシカルボニル基、トリフルオロアセチル基、1-ブチルオキシカルボニル基、トリチル基、2-p-ジフェニル-イソプロポキシカルボニル基などによつて置換される。エステル基はメタノール、エタノール、1-ブタノール、シアノメチルアルコールなどのアルカノール、ベンジルアルコール、p-ブロモベンジルアルコール、p-クロロベンジルアルコ

- 5 -

ール、2, 6-ジクロロベンジルアルコール、p-メトキシベンジルアルコール、p-ニトロベンジルアルコール、ベンズヒドリルアルコール、ベンゾイルメチルアルコール、p-ブロモベンゾイルメチルアルコール、p-クロロベンゾイルメチルアルコールなどのアラルカノール、2, 4, 6-トリクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、ペンタクロロフェノール、p-ニトロフェノール、2, 4-ジニトロフェノールなどのフェノール、チオフエノール、p-ニトロチオフエノールなどのチオフエノールなどによつて置換される。

例えば、アミノ基に使用する保護基としては、ホルミル基、トリフルオロアセチル基、フタロイル基、p-トルエンスルホニル基、o-ニトロフェニルスルフェニル基などのアシル基、ベンジルオキシカルボニル基、o（または p）-プロモベンジルオキシカルボニル基、o（または p）-クロロベンジルオキシカルボニル基、p-ニトロベンジルオキシカルボニル基、p-メトキシベンジルオキシカルボニル基などのベンジルオキシカルボニル基、トリクロロエチルオキシカルボニル基、1-ブチルオキシカルボニル基、1-アミルオキシカルボニル基、ジイソプロピルメチルオキシカルボニル基などの脂肪族オキシカルボニル基、2-フェニル-イソプロポキシカルボニル基、2-

- 4 -

ール、2, 6-ジクロロベンジルアルコール、p-メトキシベンジルアルコール、p-ニトロベンジルアルコール、ベンズヒドリルアルコール、ベンゾイルメチルアルコール、p-ブロモベンゾイルメチルアルコール、p-クロロベンゾイルメチルアルコールなどのアラルカノール、2, 4, 6-トリクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、ペンタクロロフェノール、p-ニトロフェノール、2, 4-ジニトロフェノールなどのフェノール、チオフエノール、p-ニトロチオフエノールなどのチオフエノールなどによつて置換される。

前記セリンの水酸基は、例えばエステル化またはエーテル化によつて保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えばアセチル基、ベンゾイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エチルオキシカルボニル基などである。またエーテル化に適する基としては、例えばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、1-ブチル基である。これらの水酸基の保護には 2, 2, 2-トリ

フルオロ-1-1-ブチルオキシカルボニルアミノエチル基、2, 2, 2-トリフルオロ-1-ベンジルオキシカルボニルアミノ基も適する。しながら、これらの水酸基を必ずしも保護する必要はない。

前記アルギニンのグアニジノ基中のアミノ基を保護するのに使用する基としては、例えばニトロ基、トシル基、ベンジルオキシカルボニル基、メシチレン-2-スルホニル基などであるが、このグアニジノ基を必ずしも保護する必要はない。

前記ヒスチジンのイミノ基を保護するのに使用する基としては、例えばベンジル基、トリチル基、ベンジルオキシカルボニル基、トシル基、2, 2, 2-トリフルオロ-1-1-ブチルオキシカルボニルアミノエチル基、2, 2, 2-トリフルオロ-1-1-ベンジルオキシカルボニルアミノエチル基などであるが、このイミノ基を必ずしも保護する必要はない。

前記のメチオニンのチオメチル基はメチルスルホキシド基にして副反応を防止するのが好ましい。

- 7 -

ペプチドと遊離の末端カルボキシル基および保護された α -アミノ基をもつアミノ酸またはペプチドを反応させることにより、実施することができる。

この場合、カルボキシル基は、例えば酸アジド、酸無水物、酸イミダゾリドまたは活性エステル、例えばシアノメチルエステル、チオフエニルエステル、*p*-ニトロチオフエニルエステル、*p*-ニトロフェニルエステル、2, 4-ジニトロフェニルエステル、2, 4, 5-トリクロロフェニルエステル、2, 4, 6-トリクロロフェニルエステル、ペンタクロロフェニルエステル、*N*-ヒドロキシコハク酸イミドエステル、*N*-ヒドロキシアリル酸イミドエステルなどに変換することによって活性化することができる。またカルボジイミド、例えば*N*, *N'*-ジシクロヘキシル-カルボジイミド、*N*-エチル-*N'*-3-ジメチルアミノプロピル-カルボジイミド、*N*, *N'*-カルボニル-ジイミダゾールまたはイソオキゾリウム塩、例えばウッドワード反応剤などの縮合剤を使用して反応さ

が、必ずしも酸化して保護する必要はない。

本発明においては、 α -アミノ基の保護に1-ブチルオキシカルボニル基、*p*-メトキシベンジルオキシカルボニル基を用い、*N*末端の α -アミノ基および側鎖のアミノ基の保護にベンジルオキシカルボニル基を用い、 α -カルボキシル基の保護にメチルエステル基、ベンジルエステル基を用い、側鎖のカルボキシル基の保護にベンジルエステル基を用い、セリンの水酸基を全く保護する場合には、その保護基にベンジル基を用い、アルギニンのグアニジノ基中のアミノ基の保護にメシチレン-2-スルホニル基を用いるのが好ましい。

本目的化合物(1)の合成においては、個々のアミノ酸および(または)低級ペプチドの縮合は、例えば保護された α -アミノ基および活性化末端カルボキシル基をもつアミノ酸またはペプチドと遊離の α -アミノ基および保護された末端カルボキシル基をもつアミノ酸またはペプチドとを反応させるか、あるいは活性化 α -アミノ基および保護された末端カルボキシル基をもつアミノ酸または

- 8 -

せることによつて活性化することができる。

本発明において好ましい縮合方法は、アジド法、活性エステル法およびカルボジイミド法である。縮合の各段階ではラセミ化が起らない方法または、ラセミ化が最少になる方法を用いるのが望ましく、好ましくはアジド法、活性エステル法、ピュンシュ法。〔Z. Naturforsch., 21b, 426 (1966)〕またはガイガー法〔Chem. Ber., 103, 788 (1970)〕などを用いるのが適する。

縮合順序は式(1)で示されるアミノ酸順序であれば、如何なる順序からも合成し得るが、*C*-末端側から順次アミノ酸および(または)ペプチドを連結させるのが好ましい。

例えば、29~34番のアミノ酸順序からなる*C*-末端フラグメントと25~28番のアミノ酸からなるペプチドフラグメントを縮合させるのがよい。この*C*-末端フラグメントとテトラペプチド25-28を縮合させるにはアジド法によつて行うのが適する。得られた*C*-末端フラグメント25-34の前に22~24番のアミノ酸順序か

らなるペプチドフラグメントを連結させるのであるが、ガイガー法により行うのが適する。得られたC-末端フラグメント22-34の前に順次19~21番のアミノ酸順序からなるペプチドフラグメント、16~18番のアミノ酸順序からなるペプチドフラグメント、13~15番のアミノ酸順序からなるペプチドフラグメント、8~12番のアミノ酸順序からなるペプチドフラグメント、4~7番のアミノ酸順序からなるペプチドフラグメントおよび1~3番のアミノ酸順序からなるペプチドフラグメントを連結させるのが好ましい。

これらの縮合はアジド法で行うのが適する。

前記のC-末端フラグメント25-34は、C-末端フラグメント29-34にその残りのアミノ酸順序25-28からなるペプチドフラグメントをアジド法により連結させるのがよい。C-末端フラグメント29-34は、~~ペプチド~~フラグメント38-34にジペプチド^ジフラグメント31-32をアジド法により連結させ、その前に残りのアミノ酸順序に各々のアミノ酸を活性エス

テル法により連結させるのがよい。

上記の縮合反応におけるα-アミノ基の保護基、例えば1-ブチルオキシカルボニル基、p-メトキシベンジルオキシカルボニル基はトリフルオロ酢酸で脱離される。α-カルボキシ基の保護基、例えばメチルエステルはこれを希薄な水酸化ナトリウム溶液で分解またはヒドラチドあるいはトリクロロエトキシカルボニルヒドラチドのような保護ヒドラチドに変え、またベンジルエステル基は無水希化水素分解、水素添加分解によつて分解し、またはヒドラチドに変えることができる。

こうして保護されたN末端α-アミノ基、ε-アミノ基、~~カルボキシル基~~側鎖カルボキシ基グアニジノ基および(または)水酸基を有するテトラトリアコンタペプチドが得られる。これらの保護基は、好ましくは酸分解、例えば無水希化水素またはトリフルオロメタンスルホン酸による方法によつて一段階で脱離され、式〔I〕の目的化合物が得られる。メチオニンのメチルスルホキシド基をチオメチル基に還元する場合には、ジチオ

- 11 -

スレイトール、チオグリコール酸、メルカプトエタノール、エタンジチオールなどによつて行つてもよい。

このようにして得られたペプチド〔I〕は、ペプチドまたは蛋白質を精製する公知の手段によつて分離精製することができる。例えば、セファデックスG-25、セファデックスG-50、セファデックスLH-20などのゲル濾過剤を用いるゲル濾過、カルボキシメチルセルロース、イオン交換樹脂などを用いるカラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなどにより行うことができる。

本発明のペプチド〔I〕は、その方法の条件により塩基またはその塩の形で得られる。塩としては、無機酸塩、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、コハク酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸などの有機酸との塩である。

本ペプチド〔I〕はある種の無機物質または有機物質を付加して錯体を形成し得る。この錯体とは添加した時に生成し、ペプチドに持続作用を与

- 12 -

える化合物を意味する。

尚、本明細書中に記載の略記号は次の意味を有する。

Phe ; L-フェニルアラニン

Tyr ; L-チロシン

Asn ; L-アスパラギン

His ; L-ヒスチジン

Met ; L-メチオニン

Val ; L-バリン

Asp ; L-アスパラギン酸

Gln ; L-グルタミン

Leu ; L-ロイシン

Lys ; L-リジン

Arg ; L-アルギニン

Trp ; L-トリプトファン

Glu ; L-グルタミン酸

Ile ; L-イソロイシン

Ser ; L-セリン

Gly ; グリシン

Z ; ベンジルオキシカルボニル

- 13 -

- 412 -

- 14 -

Boc ; t-ブトキシカルボニル

Z (OMe) ; P -メトキシベンジルオキシカルボニル

Mis ; N-メシチレン-2-スルホニル

OBzl ; ベンジルエステル

OMe ; メチルエステル

OTCP ; 2, 4, 5-トリクロロフェニルエステル

ONp ; P -ニトロフェニルエステル

OSu ; N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル

NHNHTroc ; トリクロロエチルオキシカルボニルヒドラジド

NHNH₂ ; ヒドラジド

TFMSA ; トリフルオロメタンスルホン酸

MSA ; メタンスルホン酸

TFA ; トリフルオロ酢酸

TosOH ; P -トールエンスルホン酸HgI₂ ; 塩化水素Et₃N ; トリエチルアミン

CHA ; シクロヘキシルアミン

DCHA ; ジシクロヘキシルアミン

EDT ; エタレンジチオール

- 15 -

溶媒系 ;

1. CHCl₃ - MeOH (10 : 0.5)
2. CHCl₃ - MeOH - 水 (8 : 3 : 1) の下層
3. CHCl₃ - MeOH-酢酸 (9 : 1 : 0.5)
4. BuOH - ピリジン-酢酸-水 (4 : 1 : 1 : 2)

担体 ; セルロース (メルク社製, DC-Alufo-
lien)

溶媒系 ;

5. BuOH - ピリジン-酢酸-水 (5 : 8 : 0.1 : 11) の上層

< アミノ酸分析 >

特記しない限り、試料は6N塩酸で110℃、
24～48時間封管中で加水分解した。

< PTH活性測定法 >

(1) PTHレセプターの調製

SD系雄ラット (体重200～250g) を断頭、放血し、開腹の後、腎を摘出し、その表面皮膜を取り除き、腎皮質部分を切り取り、氷冷する。以下の操作はできるだけ低温 (0～4℃) 下で行う。上記の腎皮質部分を0.25Mシュクロースお

DCC ; NN'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

HOBT ; 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール

EDTA ; エチレンジアミン四酢酸塩

DMF ; ジメチルホルムアミド

DMSO ; ジメチルスルホキシド

HMPA ; ヘキサメチルホスホルアミド

MeOH ; メタノール

EtOH ; エタノール

BuOH ; n -ブタノールCHCl₃ ; クロロホルム

THF ; テトラヒドロフラン

エーテル ; ジエチルエーテル

TLC ; 薄層クロマトグラフィー

次に実施例を挙げて本発明の製造例を具体的に説明する。

尚、これら実施例で使用した薄層クロマトグラフィー (TLC) の担体および展開溶媒系、アミノ酸分析の条件並びにPTH活性測定法は次の通りである。

< TLC >

担体 ; シリカゲルQ

- 16 -

および1mMEDTA含有10mMトリス塩酸塩緩衝液 (pH 7.5) (以下A液と称す) 中に浸し、テフロンベッセルを用いたガラス外套管で腎皮質をその湿重量 (g) の8倍容量 (ml) のA液を加えてホモゲナイズする。このホモジネートを150Xg、10分間遠心分離し、その上清をさらに2200Xg、15分間遠心分離する。上清を捨て、沈殿物の上層の浮濁色の部分をA液に懸濁し、この懸濁液を2200Xg、15分間遠心分離により洗浄し、再び懸濁して容器に分注し、-70℃で凍結して-20℃で保存する。

(2) PTHとPTHレセプターの反応

被検品のh-PTH (1-34) NH₂を2μg/mlと10μg/mlの濃度になるようにATPMg 2mM、MgCl₂ 10mM、KCl 60mM、GTP 20μM、インブチルメチルキサンチン1mM、クレアチンホスフェート8mMおよび牛血清アルブミン (BSA) 0.2%含有100mMトリス塩酸塩緩衝液 (pH 7.5) (以下B液と称す) に溶かし、これを標準品牛PTH (1-84) についても行う。

これら4つの溶液を50 μ lづつガラス試験管に
分注し、各々8本づつ用意する。試料は氷水中に
保ち、ATPなど他の物質の分解を抑える。-20
℃に保存したPTHレセプター調製品を室温で解
凍し、A液に予め溶かしておいたクレアチンキナ
ーゼを加え、さらにA液でクレアチンキナーゼ
0.1 mg/ml、PTHレセプター調製品蛋白量1.4
mg/mlになるように調製し、氷冷中で保つ。上記
の分注された試料溶液を37℃の恒温槽に数分間
つけた後に、上記のPTHレセプター-クレアチ
ンキナーゼ液を50 μ lづつ加え、37℃で10分
間インキュベートする。次いで0.1M酢酸緩衝液
(pH 4.0) 100 μ lを加え、直ちに氷水中につ
けた後、すみやかに試験管を沸騰水で1分間加熱
し、反応を停止させる。

(3) 生成C-AMPの測定

上記の反応停止試料を蒸留水で10~30倍に
希釈し、2000 X G, 15分間の遠心分離により
除蛋白を行う。その上清のC-AMP量をRIA
キット(ヤマサ醤油社製)で測定する。

- 19 -

攪拌を続けた。15分後、濃アンモニア水20.9
mlを加え、食塩-氷の媒剤下で冷却しながら4時
間攪拌した。析出した結晶をろ取した。ろ液を減
圧濃縮し、得られた結晶を先の結晶と合せて5%
アンモニア水で3回、水で3回洗浄した後、ジオ
キサン-メタノール-酢酸エチルで再結晶化して
〔1〕を得た。収量28.186 g (収率85.8%)
融点; 180~182℃

TLC; $R_{f2} = 0.74$ 〔 α 〕_D²⁰ -17.89° (c=0.92, DMF)元素分析 (C₁₆H₁₈N₂O₄として)

	C %	H %	N %
計算値	65.84	6.14	8.53
測定値	65.76	6.28	8.44

2) F (38-84); Z (OMe)-Asn-Phe-NH₂ (2)

〔1〕5.878 gにアニソール3.89 ml、TFA
15.56 mlを加え、0℃で1時間攪拌した後、
TFAを室温で減圧下留去した。残渣をヘキサ
ンで処理し、生じた沈殿物を傾斜法により分離した。

(4) PTH力価の測定

C-AMPの測定値をPM/mg PTHレセプ
ター-蛋白/分の単位に換算し、これを反応の値とし、
標準品によつて得られた値に対して被検品を平行
線検定2×2点法を用いて検定する。

実施例 1

h-PTH (1-34) NH₂; H-Ser-Val
-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met
-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His
-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg
-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys
-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His
-Asn-Phe-NH₂

1) F (34); Z (OMe)-Phe-NH₂ (1)

Z (OMe)-Phe-OH 82.984 g (0.1M)をT
HF 200 mlに溶かし、これにEt₃N 15.29 ml
(0.11M)を加えた後、-20℃に冷却下攪
拌しながらインブチルクロロホルメート14.45
ml (0.11M)を滴下した。結晶が析出し、攪拌
が困難となつたので、THF 200 mlを追加し、

- 20 -

得られたH-Phe-NH₂・TFAにDMF 60 ml、
Et₃N 2.51 mlを加え、次いでZ (OMe)-Asn
-ONp 7.471 g (17.9mM)、Et₃N 2.51 ml
を加え、室温で20時間攪拌した。反応液を冷却
下少量の酢酸で中和した後、減圧濃縮した。残渣
に5%クエン酸水、酢酸エチルを加えて結晶化し、
5%クエン酸、5%重曹水、水の順で結晶を洗浄
した後、DMSO-メタノールで再結晶化して
〔2〕を得た。収量6.01 g (収率75.9%)
融点; 243~245℃

〔 α 〕_D²⁵ -19.3° (c=0.9, DMSO)TLC; $R_{f2} = 0.60$, $R_{f3} = 0.15$ 元素分析 (C₂₂H₂₆N₄O₆として)

	C %	H %	N %
計算値	59.72	5.92	12.66
測定値	59.43	5.93	12.68

3) F (31-84); Z (OMe)-Val-His -Asn-Phe-NH₂ (3)

〔2〕6.00 gにアニソール4.48 ml、TFA

- 21 -

- 414 -

- 22 -

17.72 mlを加え、0℃で60分間攪拌した後、TFAを室温で減圧下留去した。残渣にヘキサンを加え生じた沈澱物を濾取した。これにDMSO-DMF(1:1)50 ml、Et₃N1.90 mlを加え、~~H-Val-His~~Asn-Phe-NH₂の溶液を得た。

一方、Z(OMe)-Val-His-NHNH₂7.049 gをDMF80 mlに溶かし、これに-50℃に冷却下3.809 N-HCl/DMF溶液15.41 ml、次いで亜硝酸イソアミル2.61 mlを加えた。-20℃で20分間攪拌後、再度-50℃に冷却下Et₃N2.51 mlを加え、これに上記のH-Asn-Phe-NH₂の溶液を加え、4℃で18時間攪拌した。反応後、溶媒を減圧下留去し、残渣に8%酢酸水、酢酸エチルを加え、生じた沈澱物を濾取した後、3%酢酸水、5%重曹水、水の順で洗浄した。DMSO-MeOHで再結晶化して〔3〕を得た。収量6.216 g(収率64.8%)
融点; 204 ~ 207℃
〔α〕_D²⁵ -13.9°(C=1.1, DMSO)

- 23 -

融点; 286~278℃

〔α〕_D²⁵ -16.3°(C=1.0, DMSO)

TLC; R_{f2} = 0.39

アミノ酸分析; Asp2.01 (2)、Val1.00 (1)、Phe1.00 (1)、His0.91 (1)

元素分析〔C₄₄H₅₃N₉O₁₁として〕

	C %	H %	N %
計算値	59.78	6.04	14.26
測定値	60.06	6.25	14.37

5) F(29-34); Z(OMe)-Gln-Asp(Obzl)-Val-His-Asn-Phe-NH₂〔5〕
〔4〕5.00 g(5.66 mM)にアニソール3.08 ml、TFA12.32 mlを加え、0℃で60分間攪拌した後、TFAを減圧下留去した。残渣にエーテルを加え、析出した沈澱物を濾取、乾燥した。これにDMF50 ml、Z(OMe)-Gln-ONp2.92 g、Et₃N2.53 mlを加え、室温で48時間攪拌した。反応液を冷却下数滴の酢酸で中和し、DMFを減圧下留去した。残渣に3%酢酸水、酢酸エチルを加え、析出した粉末を濾取した後、8

TLC; R_{f2} = 0.30

アミノ酸分析; Val1.02 (1)、His0.95 (1)、Asp0.98 (1)、Phe1.00 (1)

元素分析〔C₃₃H₄₂N₈O₈・1½/2H₂Oとして〕

	C %	H %	N %
計算値	56.16	6.43	15.88
測定値	55.90	6.14	15.70

4) F(30-34); Z(OMe)-Asp(Obzl)-Val-His-Asn-Phe-NH₂〔4〕

〔3〕6.00 gにアニソール2.88 ml、TFA11.52 mlを加え、0℃で60分間攪拌した後、TFAを室温で減圧下留去した。残渣にエーテルを加え、析出した結晶を濾取、乾燥した後、DMF50 ml、Et₃N2.46 ml、Z(OMe)-Asp(Obzl)-ONp5.3898 g、Et₃N1.23 mlを加え、室温で18時間攪拌した。反応後、DMFを減圧下留去し、残渣に3%酢酸水、酢酸エチルを加えた。得られた粉末を3%酢酸水、5%重曹水、水の順で洗浄後、DMF-メタノールから3回結晶化して〔4〕を得た。収量6.00 g(収率76.8%)

- 24 -

%酢酸水、5%重曹水、水の順で洗浄した。DMSO-メタノールで2回再沈澱して〔5〕を得た。収量5.111 g(収率90.3%)

融点; 284 ~ 238℃

〔α〕_D²⁵ -22.6°(C=1.1, DMSO)

TLC; R_{f3} = 0.31

アミノ酸分析; Glu1.06 (1)、Asp2.06 (2)、Val1.00 (1)、Phe1.00 (1)、His0.83 (1)

元素分析〔C₄₉H₆₁N₁₁O₁₃・H₂Oとして〕

	C %	H %	N %
計算値	57.13	6.16	14.96
測定値	57.39	6.08	14.76

6) F(27-28) Z(OMe)-Lys(Z)-Leu-OMe〔6〕

H-Leu-OMe2.91 gをDMF50 mlに溶かし、0℃に冷却してEt₃N2.24 mlでpH7に調節後、Z(OMe)-Lys(Z)-OTCP10 gをTHF50 mlに溶解した溶液とEt₃N2.24 mlを加えて室温で20時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣を酢酸エチルおよび5%クエン酸と共に

- 25 -

-415-

- 26 -

ふりませた。有機層を5%クエン酸、食塩水、5%重曹水、食塩水の順で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣にエーテルを加え結晶を得た。MeOH-エーテルから再結晶化して〔6〕7.33g(収率80.1%)を得た。

融点; 107~108℃

$[\alpha]_D^{20} = -21.2^\circ$ (C=0.9, MeOH)

TLC; $R_{f2} = 0.73$, $R_{f3} = 0.63$

元素分析 (C₃₀H₄₁O₃N₈として)

	C %	H %	N %
計算値	63.08	7.23	7.85
測定値	63.18	7.28	7.26

7) F(26-28)Z(OMe)-Lys(Z)-Lys(Z)-Leu-OMe (7)

〔6〕5.72gにアニソール2.17ml、TFA 8.68mlを加え、0℃で1時間攪拌した。TFAを減圧下留去し、残渣をn-ヘキサンで3度洗浄し乾燥した。これをDMF 20mlに溶解し、Et₃N 1.4mlでpH 7に調節後、Z(OMe)-Lys(Z)-OTCP 6.24g、Et₃N 1.4mlを加え室温で20

- 27 -

6.71gを酢酸エチル20mlおよび1N塩酸8.64mlと共にふりませた。有機層を水20mlで洗浄後、減圧濃縮した。この残渣をTHF 20mlに溶かし、Et₃N 1.45mlを加え、-10℃で塩化イソブチロキシカルボニル1.86mlを加え5分間攪拌した。これに上記の粉末をDMF 20mlに溶かし、Et₃N 1.00mlでpH 7に調節した溶液を加え、0℃で4時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣に5%クエン酸、エーテルを加え生じた沈澱を浮取した。5%クエン酸、5%重曹水、水の順で洗浄した。DMF-酢酸エチルから再結晶化して〔8〕5.78g(収率68.5%)を得た。

融点; 151~152℃

$[\alpha]_D^{20} = -8.9^\circ$ (C=0.7, DMF)

TLC; $R_{f2} = 0.76$, $R_{f3} = 0.75$

元素分析 (C₅₉H₈₁O₁₄N₉Sとして)

	C %	H %	N %
計算値	60.44	6.96	10.75
測定値	60.48	6.97	10.65

9) F(25-28); Z(OMe)-Arg(Mts)-

時間攪拌した。反応後、DMFを減圧下留去し、残渣に5%クエン酸、エーテルを加え生じた沈澱物を浮取した。この沈澱物を5%クエン酸、水、5%重曹水、水の順で洗浄した。MeOH-エーテルから再結晶化して〔7〕6.71g(収率80.5%)を得た。

融点; 153~154℃

$[\alpha]_D^{20} = -15.8^\circ$ (C=1.1, DMF)

TLC; $R_{f1} = 0.41$

元素分析 (C₄₄H₅₉O₁₁N₅として)

	C %	H %	N %
計算値	63.37	7.13	8.40
測定値	63.54	7.21	8.38

8) F(25-28)Z(OMe)-Arg(Mts)-Lys(Z)-Lys(Z)-Leu-OMe (8)

〔7〕6.00gにアニソール2.33ml、TFA 9.33mlを加え、0℃で1時間攪拌した。TFAを減圧下留去し、残渣にエーテルを加えた後、生じた沈澱物を浮取し、乾燥して粉末を得た。

一方、Z(OMe)-Arg(Mts)-OH·CHA

- 28 -

Lys(Z)-Lys(Z)-Leu-NHNH₂ (9)

〔8〕5.78gをMeOH 50mlに溶解し、これにヒドラジン水和物1.23mlを加え室温で一晩放置した。析出した結晶を浮取し、EtOHで洗浄した。MeOH-EtOHから再結晶化して〔9〕5.25g(収率91.3%)を得た。

融点; 178~180℃

$[\alpha]_D^{20} = -10.1^\circ$ (C=0.7, DMF)

TLC; $R_{f2} = 0.48$

アミノ酸分析; Leu 1.01 (1), Lys 1.94 (2), Arg 1.01 (1)

元素分析 (C₅₈H₈₁O₁₃N₁₁Sとして)

	C %	H %	N %
計算値	59.42	6.96	13.14
測定値	59.29	7.17	12.87

10) F(25-34); Z(OMe)-Arg(Mts)-Lys(Z)-Lys(Z)-Leu-Gln-Asp(OBzl)-Val-His-Asn-Phe-NH₂ (10)

〔5〕5.777gにアニソール3.10ml、TFA 12.40mlを加え、0℃で1時間攪拌した。TFA

を減圧下留去し、残渣にエーテルを加えた後、生じた沈澱物を濾取し、乾燥して粉末を得た。これにDMF 30 ml、 Et_3N 1.59 mlを加え、中和溶液を得た。

[9]	8.0308 g
DMF	20 ml
8.936N-HCl / DMF溶液	4.18 ml
亜硝酸イソアミル	1.09 ml
Et_3N	8.44 ml

上記試薬を用いて前項8)の方法と同様にして得たアジド溶液に上記の中和溶液を加え、4℃で18時間攪拌した。反応液のニンヒドリン反応は陰性であつたが、さらに

[9]	2.00 g
DMF	10 ml
8.936N-HCl / DMF溶液	1.04 ml
亜硝酸イソアミル	0.27 ml
Et_3N	0.86 ml

の試薬を用いて調製したアジド溶液を追加し、18時間攪拌した。反応液を冷却下酢酸数滴で中和し、DMFを減圧下留去した。残渣に8%酢酸水、酢

- 81 -

酸、水の順で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をMeOHに溶かし、DCHA 5.45 gを加える。MeOHを減圧下留去して、エーテルを加え結晶化した。MeOH-エーテルから再結晶化して〔11〕を得た。収量10.15 g (収率 97.0%)。

融点; 192~195℃

$[\alpha]_D^{20}$; -22.9° (C=0.6, MeOH)

TLC; $R_{f2}=0.67$ 、 $R_{f3}=0.69$

元素分析 ($\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{O}_5\text{N}_3 \cdot \text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{N}$ として)

	C %	H %	N %
計算値	68.19	9.09	9.36
測定値	68.07	9.14	9.27

12) F (22-24) Boc-Glu(OBzl)-Trp-Leu-OH·DCHA (12)

〔11〕10.0 gを酢酸エチル50 ml、水50 mlに懸濁し、1N塩酸17.1 mlを0℃で加えた。析出した塩を濾去した後、有機層を食塩水で洗浄して、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。酢酸エチルを減圧下留去して、油状物を得た。これに2% E

酸エチルを加え、生じた沈澱物を濾取し、8%酢酸水、5%重曹水、水の順で洗浄した。DMF-SO-MeOHで3回再沈澱化して〔10〕を得た。収量9.171 g (収率80.8%)。

融点; 226~230℃

$[\alpha]_D^{25}$; -17.8° (C=1.0, DMSO)

TLC; $R_{f2}=0.40$

アミノ酸分析; Leu 0.97 (1)、Lys 2.02 (1)、Arg 1.19 (1)、Asp 1.96 (2)、Glu 0.98 (1)、Val 0.97 (1)、Phe 1.00 (1)、His 0.79 (1)

11) F (28-24) Boc-Trp-Leu-OH·DCHA (11)

Boc-Trp-ONp 10.65 gをDMF 30 mlに溶解した。これに0℃で、H-Leu-OH 8.9 gを水10 ml、DMF 30 mlおよび Et_3N 6.95 mlに溶かして加え、室温で一夜攪拌した。溶媒を減圧下留去し、残渣を5%重曹水、酢酸エチルと共にふりませた。水層をクエン酸で酸性にし、酢酸エチルを加えてふりませた。有機層を5%クエン

- 32 -

DTを含むアニソール5.57 mlとTFA 22.28 mlを加え、0℃で窒素ガス下、1時間攪拌した。TFAを減圧下留去し、n-ヘキサンで3度洗浄後、乾燥した。これをDMF 50 mlに溶かし、Boc-Glu(OBzl)-OSu 7.43 g、 Et_3N 4.79 mlを加え、4℃で16時間攪拌した。DMFを減圧下留去し、残渣を5%アンモニア水で溶かし、エーテルで洗浄した。水層をクエン酸で酸性とし、生じた油状物を酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をMeOHに溶かし、DCHA 2.8 mlを加え、MeOHを減圧濃縮し、エーテルを加えて結晶化した。MeOH-エーテルから3度再結晶化して〔12〕を得た。収量7.84 g (収率 57.0%)。

融点; 149~150℃

$[\alpha]_D^{20}$; -28.1° (C=1.3, MeOH)

TLC; $R_{f2}=0.53$ 、 $R_{f3}=0.71$

アミノ酸分析; Trp 0.76 (1)、Glu 1.12 (1)、Leu 1 (1) [4M-MSA, 110℃, 48時間]

元素分析 ($C_{34}H_{44}O_8N_4 \cdot C_{12}H_{23}N$ として)

	C %	H %	N %
計算値	67.53	8.26	8.56
測定値	67.23	8.28	8.69

特開昭58-96052(10)

13) F (22-34) , Boc - Glu (OBzl) - Trp
- Leu - Arg (Mts) - Lys (Z) - Lys (Z) -
Leu - Gln - Asp (OBzl) - Val - His - Asn
- Phc - NH₂ [13]

[10] 7.00 g にアニソール 3.83 ml、TFA 15.32 ml
を加え、氷剤で冷却下 60 分間攪拌した。TFA
を減圧下留去し、残渣にエーテルを加え、生じた
沈澱物を濾取した後、5%重曹水、水の順で洗浄
し、乾燥して粉末を得た。

一方、[12] 4.319 g に DMF - HMPA - DMSO
(1:1:1) の混液 30 ml、N-メチルホルモリ
ン 0.70 ^{ml} _{5.40} を加えて攪拌した後、前記の粉末および HOBt
0.857 g を加えて溶解させた。これに DCC 1.308
g を加えて、4℃で18時間攪拌した。反応液は
ニンヒドリン反応で陽性であつたので、さらに D
CC 218 mg を加え、18時間攪拌した。反応後、
冷却下酢酸で中和し、溶媒を減圧下留去した。残
渣に3%酢酸水、酢酸エチルを加え、生じた沈澱
物を濾取し、3%酢酸水、5%重曹水、水の順で
洗浄した。DMF-MeOH で4回再沈澱化して[13]

- 35 -

を得た。収量 5.013 g (収率 58.2 %)

融点 : 282℃ (分解)

$[\alpha]_D^{25} - 19.4^\circ$ ($C = 0.8$, DMSO)

TLC ; Rf2 = 0.43 , Rf3 = 0

アミノ酸分析 : Glu 1.99 (2)、Leu 1.92 (2)、
Asp 1.96 (2)、Val 0.95 (1)、Phc 1.00 (1)、
Lys 2.12 (2)、His 0.93 (1)、Arg 0.98 (1)

元素分析 ($C_{123}H_{164}N_{24}O_{27}S$ として)

	C %	H %	N %
計算値	60.47	6.77	13.76
測定値	60.88	6.78	13.88

14) F (20-21) ; Z (OMe) - Arg (Mts) -
Val - NHNHTrc [14]

Z (OMe) - Val - NHNHTrc 22.79 g にアニ
ソール 10.74 ml、TFA 42.96 ml を加え、0℃1時間
攪拌した。TFA を減圧下留去し、残渣を n-ヘ
キサンで3度洗浄し、乾燥して油状物を得た。

一方、Z (OMe) - Arg (Mts) - OH · CHA 30.0
g を酢酸エチル 150 ml、水 100 ml に懸濁し、1 N
塩酸 48.41 ml を 0℃で加えた。析出した塩を濾去し

た後、有機層を食塩水で洗浄して、無水硫酸ナト
リウムで乾燥した。酢酸エチルを減圧下留去して
油状物を得た。これを THF 100 ml に溶かし、Et₃N
81.3 ml を加え、-10℃で塩化イソブチロキシカ
ルボニル 7.53 ml を加え5分間攪拌した。これに上
記の油状物を DMF 50 ml に溶かし、Et₃N 6.78 ml
で pH 7 に調節した溶液を加え、-10℃で2時
間、室温で16時間攪拌した。反応液を減圧濃縮
し、残渣を酢酸エチルおよび5%クエン酸と共に
ふりまぜた。有機層を5%クエン酸、食塩水、1
%アンモニア水、食塩水の順で洗浄し、無水硫酸
ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた油
状物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー〔溶
出溶媒 CHCl₃ - MeOH (20:0.5) 〕により精製
した。酢酸エチル-n-ヘキサンより結晶化して
[14] を得た。収率 29.25 g (収率 74.7 %)

融点 : 114 ~ 116℃

$[\alpha]_D^{20} - 24.6^\circ$ ($C = 1.1$, MeOH)

TLC ; Rf2 = 0.62、Rf3 = 0.46

元素分析 ($C_{32}H_{44}O_9N_7SCl_3$ として)

- 38 -

- 37 -

- 418 -

C % H % N %

計算値 47.50 5.48 12.12

測定値 47.24 5.43 11.88

15) F (19 - 21) Boc - Glu (OBzl) - Arg

(Mts) - Val - NHNH₂Proc [15]

[14] 730 g にアニソール 389 ml、TFA 15.57

ml を加え、0℃ 1 時間攪拌する。TFA を減圧下留去し、残渣にエーテルを加えた後、生じた沈澱物を濾取し、乾燥して粉末を得た。これを DMF 50 ml に溶かし、Et₃N 12.6 ml で PH 7 に調節して、Boc - Glu (OBzl) - ONp 413 g と Et₃N 12.6 ml を加え、室温で 16 時間攪拌した。溶媒を減圧下留去し、残渣に 5% クエン酸、エーテルを加え生じた沈澱物を濾取した。5% クエン酸、水、5% 重層水、水の順で洗浄し、MeOH-エーテルから再結晶化して [15] を得た。収量 6.29 g (収率 72.5%)。

融点: 159 ~ 160℃

$[\alpha]_D^{20}$: -31.9° (C = 1.1, MeOH)

TLC: R_{f2} = 0.68, R_{f3} = 0.74

- 39 -

測定値 55.73 7.18 14.17

17) F (19 - 34); Boc - Glu (OBzl) - Arg

(Mts) - Val - Glu (OBzl) - Trp - Leu -

Arg (Mts) - Lys (Z) - Lys (Z) - Leu -

Gln - Asp (OBzl) - Val - His - Asn -

Phe - NH₂ [17]

[13] 480 g (1.96 mM) にアニソール (2% EDT を含む) 326 ml、TFA 12.8 ml を加え、0℃ で 60 分間攪拌した。TFA を減圧下留去し、残渣にヘキサンを加え、生じた沈澱物を濾取、乾燥して粉末を得た。これに DMF 30 ml、Et₃N 0.55 ml を加え、中和溶液を得た。

[16] 2.32 g

DMF 10 ml

3.936 N-HCl/DMF 溶液 1.79 ml

亜硝酸イソアミル 0.47 ml

Et₃N 0.98 ml

N-メチルモルホリン 0.78 ml

上記試薬を用いて前項 3) の方法と同様にして得たアジド溶液に上記の中和溶液を加え、4℃ で

元素分析 [C₄₀H₅₇O₁₁N₈SG₂₃として]

C % H % N %

計算値 49.82 5.96 11.62

測定値 49.85 5.97 11.60

16) F (19 - 21); Boc - Glu (OBzl) - Arg (Mts)

- Val - NHNH₂ [16]

[15] 629 g を酢酸 15 ml に溶解し、亜鉛末 4.25 g を加え、室温で 8 時間攪拌した。酢酸を減圧下留去し、残渣に 5% 重層水を加え生じた沈澱物を濾取した。飽和 EDTA 水溶液、水の順で洗浄した。MeOH-エーテルから再結晶化して [16] を得た。収量 2.64 g (収率 51.3%)。

融点: 186 ~ 187℃

$[\alpha]_D^{20}$: -5.6° (C = 0.7, DMF)

TLC: R_{f2} = 0.58, R_{f3} = 0.55

アミノ酸分析: Glu 1.20 (1), Leu 1 (1),

Arg 1.07 (1)

元素分析 [C₃₇H₅₆O₉N₈S · 1/2 H₂O として]

C % H % N %

計算値 55.69 7.20 14.04

- 40 -

48 時間攪拌した。反応後、冷却下酢酸で中和し、溶媒を減圧下留去した。残渣に 3% 酢酸水、酢酸エチルを加え、生じた沈澱物を濾取し、3% 酢酸水、5% 重層水、水の順で洗浄した。DMF-酢酸エチルで再沈澱化して粗生成物を得た。これを CHCl₃-MeOH-水 (8:3:1) 5 ml に溶かしてシリカゲル (2.3 × 50 cm) にチャージし、溶出溶媒 CHCl₃-MeOH-水 (8:3:1) を用いるカラムクロマトグラフィーにより精製した。R_{f2} = 0.41 の溶出区分 (R_{f2} = 0.51 の区分は除く) を集め、減圧濃縮した。残渣に酢酸エチルを加えて粉末化して [17] を得た。収量 4.07 g (収率 67%)。

融点: 255℃ (分解)

$[\alpha]_D^{25}$: -1.0° (C = 1.0, DMF)

TLC: R_{f2} = 0.41, R_{f4} = 0.73

アミノ酸分析: Glu 3.06 (3), Arg (2), Val 1.87

(2), Asp 2.07 (2), Leu 2.03 (2), Phe 1.00 (1),

Lys 2.16 (2), His 0.99 (1)

元素分析 [C₁₅₅H₂₀₈N₃₀O₃₄S₂ · 1/2 H₂O として]

	C %	H %	N %
計算値	59.54	6.80	13.44
測定値	59.24	6.68	13.37

18) F (16 - 18) ; Boc - Asn - Ser - Met - OMe [18]

Chem. Pharm. Bull., 27 (2), 499 ~ 507 (1979)
に記載の方法で得た Z (OMe) - Ser - Met - OMe 18.651 g にアニソール 9.78 ml、TFA 39.12 ml を加え、0℃で60分間攪拌した後、TFA を減圧下留去した。残渣をヘキサンで洗浄後、エーテルを加え、生じたガム状の沈澱物を傾斜法により分離し、乾燥した。これにDMF 90 ml、Et₃N 630 ml を加えて攪拌した後、Boc - Asn - ONp 17.49 g、Et₃N 6.93 ml を加えて16時間攪拌した。反応後、DMF を減圧下留去し、得られた油状物に5%クエン酸含有飽和食塩水、酢酸エチルを加えてふりませた。酢酸エチル層を5%クエン酸水、5%重曹水、飽和食塩水で洗浄し、無水芒硝で乾燥後、減圧濃縮した。残渣をエーテルで処理して結晶化し、メタノール-エーテルで再結晶化して[18]

- 43 -

元素分析 [C₁₇H₃₂N₆O₇S として]

	C %	H %	N %
計算値	48.95	6.94	18.09
測定値	48.86	7.02	17.87

20) F (16 - 34) ; Boc - Asn - Met - Glu (OBzl) - Arg (Mts) - Val - Glu (OBzl) - Trp - Leu - Arg (Mts) - Lys (Z) - Leu - Gln - Asp (OBzl) - Val - His - Asn - Phe - NH₂ [20]

[17] 500 mg (0.161 mM) にアニソール (2 % EDT 含有) 0.35 ml、TFA 1.40 ml を加え、0℃で60分間攪拌した後、TFA を減圧下留去した。残渣にヘキサンを加え、生じた沈澱物を濾取し、乾燥して粉末を得た。これにDMF 5 ml、Et₃N 45.2 μl を加えて、中和溶液を得た。

[19]	150.5 mg
DMF	0.20 ml
3.936 N - HCl / DMF 溶液	0.20 ml
亜硝酸イソアミル	51.7 μl
Et ₃ N	108.4 μl

- 45 -

を得た。収量 12.96 g (収率 62.0 %)

融点 ; 133 ~ 135 °C

$[\alpha]_D^{25} = -31.8^\circ$ (C = 0.9, DMF)

TLC ; Rf₂ = 0.51、Rf₃ = 0.24

元素分析 [C₁₈H₃₂N₄O₈S として]

	C %	H %	N %
計算値	46.54	6.94	12.06
測定値	46.77	6.89	11.98

19) F (16 - 18) ; Boc - Asn - Ser - Met - NHNH₂ [19]

[18] 4.00 g を MeOH 50 ml に溶かし、これにヒドラジン水和物 2.15 ml を加え、室温で18時間放置した。析出した結晶を EtOH で処理し、濾取した後、EtOH で洗浄した。DMF - EtOH で再結晶して [19] を得た。収量 2.893 g (収率 72.4 %)

融点 ; 212 ~ 216 °C

$[\alpha]_D^{25} = -26.4^\circ$ (C = 1.0, DMF)

TLC ; Rf₂ = 0.32、Rf₃ = 0.10

アミノ酸分析 ; Ser 0.88 (1)、Asp 1.00 (1)、Met 0.40 (1)

- 44 -

上記試薬を用いて前項 3) の方法と同様にして得たアジド溶液に上記の中和溶液を加え、4℃で48時間攪拌した。反応液を冷却下酢酸で中和し、DMF を減圧下留去し、残渣にエーテル、5%クエン酸水溶液を加え、生じた沈澱物を濾取した。5%クエン酸水、5%重曹水、水で各々3回ずつ洗浄し、DMF - 酢酸エチルで5回再沈澱化して [20] を得た。収量 463.8 mg (収率 83.9 %)

融点 ; 143 ~ 144 °C

$[\alpha]_D^{25} = -2.7^\circ$ (C = 0.8, DMF)

TLC ; Rf₂ = 0.57、Rf₄ = 0.79

アミノ酸分析 ; Asp 3.18 (3)、Ser 0.90 (1)、Met 0.70 (1)、Glu 2.98 (3)、Val 1.92 (2)、Leu 2.01 (2)、Phe 1.00 (1)、Lys 2.14 (2)、His 0.96 (1)、Arg 2.12 (2)

元素分析 [C₁₆₇H₂₂₈N₃₄O₃₉S₃ · 4H₂O として]

	C %	H %	N %
計算値	57.24	6.79	13.59
測定値	57.34	6.59	13.47

21) F (14 - 15) ; Z (OMe) - His - Leu - OMe [21]

- 46 -

Z (OMe) - His - NHNH ₂	20.00 g
4.78 N-HCl / DMF 溶液	45.21 ml
亜硝酸イソamil	9.58 ml
DMF	20 ml
Et ₃ N	40.32 ml

Z (OMe) - His - NHNH₂を前項3)の方法と

同様にして得られたアジド溶液に、H-Leu-OMe・HCl 9.08 g をDMF 50 ml に溶かし、Et₃N 7.00 ml でpH 7 に調節した溶液を加えた後、4℃で20時間攪拌した。DMF を減圧下留去し、残渣を酢酸エチルおよび5%重曹水と共にふりませた。有機層を5%重曹水、食塩水の順で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣にエーテルを加えて結晶化し、MeOH-エーテルから再結晶化して〔21〕16.32 g (収率 73.1%)を得た。

融点: 110 ~ 111℃

$[\alpha]_D^{20}$: -24.1° (C = 1.1, MeOH)

TLC: R_f2 = 0.65, R_f3 = 0.17

元素分析 [C₂₂H₃₀O₆N₄として]

- 47 -

TLC: R_f2 = 0.65

元素分析 [C₃₂H₄₆O₈N₆として]

	C %	H %	N %
計算値	59.61	7.50	13.04
測定値	59.61	7.45	13.03

23) F (13-15); Boc-Lys(Z)-His-Leu-NHNH₂〔23〕

〔22〕2.65 g をMeOH 20 ml に溶解し、ヒドラン水合物 1.03 ml を加え、室温で2日間放置した。MeOH を減圧下留去し、残渣に水を加えた後、生じた沈澱物を濾取した。MeOH-酢酸エチルから再結晶化して〔23〕2.10 g (収率 79.3%)を得た。

融点: 167 ~ 169℃

$[\alpha]_D^{20}$: -21.4° (C = 1.0, DMF)

TLC: R_f2 = 0.48

アミノ酸分析: Leu 1 (1)、Lys 0.97 (1)、

His 0.91 (1)

元素分析 [C₃₁H₄₆O₇N₈として]

	C %	H %	N %
計算値	57.74	7.50	17.38

- 49 -

	C %	H %	N %
計算値	59.18	6.77	12.55
測定値	58.93	6.70	12.32

22) F (13-15); Boc-Lys(Z)-His-Leu-OMe〔22〕

〔21〕5.11 g にアニソール 2.49 ml、TPA 9.96 ml を加え、0℃で1時間攪拌した。TPA を減圧下留去し、残渣にエーテルを加えた後、生じた沈澱物を濾取し、乾燥した。得られた粉末をDMF 20 ml に溶かし、Et₃N 3.19 ml を加えpH 7 に調節後、Boc-Lys(Z)-OSu を加えて、室温で20時間攪拌した。DMF を減圧下留去し、残渣を酢酸エチルおよび5%重曹水と共にふりませた。有機層を5%重曹水、食塩水の順で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。酢酸エチルを減圧下留去し、残渣にエーテルを加えて結晶化し、MeOH-エーテルから再結晶化して〔22〕5.42 g (収率 73.7%)を得た。

融点: 144 ~ 147℃

$[\alpha]_D^{20}$: -33.6° (C = 0.7, MeOH)

- 48 -

測定値 57.58 7.52 17.38

24) F (13-34); Boc-Lys(Z)-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu(OBzl)-Arg(Mts)-Val-Glu(OBzl)-Trp-Leu-Arg(Mts)-Lys(Z)-Lys(Z)-Leu-Gln-Asp(OBzl)-Val-His-Asn-Pho-NH₂〔24〕

〔20〕435 mg (0.127 mM) にアニソール (2% BDT 含有) 0.41 ml、TPA 1.64 ml を加え、0℃で90分間攪拌した後、TPA を減圧下留去した。残渣にヘキサンを加え、生じた油状物を傾斜法により分離した後、エーテルを加えた。生じた沈澱物を濾取し、乾燥して粉末を得た。これにDMF 5 ml、Et₃N 35 μl を加え、中和溶液を得た。

〔23〕 163.8 mg

DMF	3 ml
8.936 N-HCl / DMF 溶液	232 μl
亜硝酸イソamil	41 μl
Et ₃ N	85 μl

上記試薬を用いて前項3)の方法と同様にして

得たアジド溶液に上記の中和溶液を加え、4℃で60時間攪拌した。反応液を冷却下酢酸で中和し、DMFを減圧下留去した。残渣に冷却下3%酢酸水、エーテルを加え、生じた沈殿物を濾取した後、3%酢酸水、5%重曹水、水の順で洗浄した。DMF-酢酸エチルで5回再沈殿化して〔24〕を得た。収量4823mg(収率96.1%)

融点：118～120℃

$[\alpha]_D^{25} = -2.7^\circ$ (C = 1.1, DMF)

TLC; Rf2 = 0.38、Rf4 = 0.75

アミノ酸分析; Lys 8.12(3)、Lys 8.18(3)、His 2.18(2)、Asp 3.10(3)、Ser 0.79(1)、Glu 2.99(3)、Val 1.96(2)、Met 0.48(1)、Phe 1.00(1)、Arg 1.99(2)

元素分析 [C₁₉₃H₂₆₄N₄₀O₄₄S₅·6H₂O として]

	C %	H %	N %
計算値	57.20	6.86	13.83
測定値	57.07	6.58	13.67

28) F(11-12); Z(OMe)-Leu-Gly-OMe [25]

- 51 -

53.04 mlを加え、0℃1時間攪拌した。TFAを減圧下留去し、残渣をn-ヘキサンで3度洗浄後、乾燥した。これをDMF 100 mlに溶解し、Et3N 8.54 mlでPH 7に調節した後、Z(OMe)-Asn-ONp 25.46 g、Et3N 8.54 mlを加え、室温で20時間攪拌した。DMFを減圧下留去し、残渣に5%クエン酸、酢酸エチルを加えた後、生じた沈殿物を濾取した。5%クエン酸、5%重曹水、水の順で洗浄し、DMF-酢酸エチルから再結晶化して〔26〕22.42 g(収率76.5%)を得る。

融点：196～197℃

$[\alpha]_D^{22} = -15.4^\circ$ (C = 0.8, DMF)

TLC; Rf2 = 0.56、Rf3 = 0.33

元素分析 [C₂₂H₃₂O₈N₄ として]

	C %	H %	N %
計算値	54.99	6.71	11.66
測定値	55.14	6.86	11.60

27) F(9-12); Z(OMe)-His-Asn-Leu-Gly-OMe [27]

[26] 14.03 gにアニソール 9.52 ml、TFA

- 53 -

H-Gly-OMe·HCl 12.56 gをDMF 50 mlに溶解し、Et3N 1.4 mlでPH 7に調節した後、Z(OMe)-Leu-ONp 41.64 g、Et3N 1.4 mlを加えて、室温で18時間攪拌した。DMFを減圧下留去し、残渣を酢酸エチルに溶解した。5%クエン酸、5%重曹水、食塩水の順で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣にエーテルを加えて結晶化した後、酢酸エチル-エーテルから再結晶化して〔25〕28.98 g(収率79.1%)を得た。

融点：78～79℃

$[\alpha]_D^{25} = 13.1^\circ$ (C = 0.7, DMF)

TLC; Rf2 = 0.71

元素分析 [C₁₈H₂₆O₆N₂ として]

	C %	H %	N %
計算値	59.00	7.15	7.65
測定値	59.17	7.16	7.59

26) F(10-12); Z(OMe)-Asn-Leu-Gly-OMe [26]

[25] 22.36 gにアニソール 13.26 ml、TFA

- 52 -

38.08 mlを加え、0℃1時間攪拌した。TFAを減圧下留去し、残渣にエーテルを加えた後、生じた沈殿物を濾取し、乾燥して粉末を得た。

Z(OMe)-His-NHNH ₂	11.67 g
5.55 N-HCl/DMF溶液	22.70 ml
亜硝酸イソアミル	5.59 ml
DMF	20 ml
Et3N	22.54 ml

上記試薬を用いて前項3)の方法と同様にして得られたアジド溶液に、上記で得た粉末をDMF 70 mlに溶解し、Et3N 4.09 mlでPH 7に調節した溶液を加えた。4℃で20時間攪拌した。DMFを減圧下留去し、残渣に5%重曹水、エーテルを加えた後、生じた沈殿物を濾取し、5%重曹水、水の順で洗浄し、DMF-MeOHから再結晶化して〔27〕15.13 g(収率83.9%)を得た。

融点：226～227℃

$[\alpha]_D^{22} = -11.1^\circ$ (C = 0.8, DMF)

TLC; Rf2 = 0.37

元素分析 [C₂₈H₃₂O₉N₄ として]

	C %	H %	N %
計算値	54.45	6.36	15.88
測定値	54.31	6.38	15.73

28) F (8-12); Boc - Met - His - Asn - Leu
- Gly - OMe [28]

[27] 5.08 g にアニソール 4.0 ml、TFA 120 ml を加え、0℃ 1時間攪拌した。TFA を減圧下留去し、エーテルを加えた後、生じた沈殿物を濾取し、乾燥して粉末を得た。これにDMF 50 ml、Et₃N 2.28 ml を加えて攪拌した後、Boc - Met - OSu 2.85 g、Et₃N 1.14 ml を加え、24時間攪拌した。反応液を冷却下酢酸で中和し、DMF を減圧下留去した。残渣をブタノールに溶かし、水で4回洗浄した後、減圧濃縮した。残渣にエーテルを加え、生じたゲル状粉末を濾取し、MeOH - EtOH で2回再結晶化して[28]を得た。収量2.57 g (収率45.7%)。

融点: 122 ~ 125℃

$[\alpha]_D^{25} = -26.7^\circ$ (C = 0.7, DMF)

TLC; R_{f2} = 0.59

- 55 -

Glu (OBzl) - Trp - Leu - Arg (Mts) -
Lys (Z) - Lys (Z) - Leu - Gln - Asp (OBzl)
- Val - His - Asn - Phe - NH₂ [30]

[24] 482.3 mg (0.122 mM) にアニソール (2% Et₂O 含有) 0.46 ml、TFA 1.84 ml を加え、0℃ で90分間攪拌した後、TFA を減圧下留去した。残渣をヘキサンで洗浄した後、エーテルを加え、生じた沈殿物を濾取、乾燥した。得られた粉末にDMF 5 ml、Et₃N 51.0 μl を加え、中和溶液を得た。

[29]	167.1 mg
DMF	3 ml
8.936 N - HCl / DMF 溶液	228.3 μl
亜硝酸イソアミル	39.0 μl
Et ₃ N	163.3 μl

上記試薬を用いて前項3)の方法と同様にして得たアジド溶液に上記の中和溶液を加え、4℃で48時間攪拌した。反応液を冷却下酢酸で中和し、DMF を減圧下留去した。残渣に5%クエン酸水、エーテルを加え、生じた沈殿物を濾取し、5%ク

29) F (8-12); Boc - Met - His - Asn - Leu
- Gly - NHNH₂ [29]

[28] 3.27 g をDMF - MeOH (4:1) 30 ml に溶かし、これにヒドラジン水和物 1.20 ml を加え、室温で18時間放置した。溶媒を減圧下留去し、残渣にEtOHで処理して結晶化させ、濾取した後、MeOH - EtOH で2回再結晶化して[29]を得た。収量2.98 g (収率90.9%)。

融点: 184 ~ 186℃

$[\alpha]_D^{25} = -33.1^\circ$ (C = 0.9, DMF)

TLC; R_{f2} = 0.31

アミノ酸分析; Asp 0.95 (1)、Gly 1.01 (1)、
Met 0.92 (1)、Leu 1.00 (1)、His 0.95 (2)

元素分析 [C₂₈ H₄₈ N₁₀ O₈ S として]

	C %	H %	N %
計算値	49.11	7.07	20.46
測定値	49.04	7.14	20.23

30) F (8-34); Boc - Met - His - Asn - Leu
- Gly - Lys (Z) - His - Leu - Asn - Ser
- Met - Gln (OBzl) - Arg (Mts) - Val -

- 56 -

エン酸水、5%重曹水、水の順で洗浄した。DMP - 酢酸エチルで5回再沈殿化して粗製の[30]を得た。これをDMF 10 ml に溶かし、セファデックス LH - 60 (3.3 × 140 cm) にチャージし、DMF で溶出した。各フラクションは9 ml ずつ分画し、43 ~ 55番目のフラクションを集めて減圧乾固した。残渣を酢酸エチルで処理して粉末化して[30]を得た。収量360.9 mg (収率6.7%)。

融点: 135 ~ 137℃

$[\alpha]_D^{25} = -4.7^\circ$ (C = 0.6, DMF)

TLC; R_{f2} = 0.34, R_{f4} = 0.69

アミノ酸分析; Asp 4.27 (4)、Gly 1.23 (1)、
Met 1.61 (2)、Leu 4.36 (4)、His 3.06 (3)、
Ser 0.81 (1)、Glu 8.03 (3)、Val 2.00 (2)、
Phe 1.00 (1)、Lys 3.15 (3)、Arg 2.00 (2)

元素分析 [C₂₁ H₃₀₀ N₄₈ O₅₀ S₄ · 5H₂O として]

	C %	H %	N %
計算値	56.55	6.81	14.66
測定値	56.32	6.66	14.77

31) F (6-7); Z (OMe) - Gln - Leu - NHNH

Troc [31]

Z (OMe) - Leu - NHNH Troc 20.00 g にアニソール 8.96 ml、TFA 35.84 ml を加え、0℃ 1 時間攪拌した。TFA を減圧下留去し、残渣を n-ヘキサンで洗浄し、乾燥した。これを DMF 120 ml に溶解し、Et₃N 11.52 ml、Z (OMe) - Gln - ONp 7.77 g を加え、室温で 18 時間攪拌した。DMF を減圧下留去し、残渣に 5% クエン酸、酢酸エチルを加えた後、生じた沈殿物を濾取した。5% クエン酸、5% 重曹水、水の順で洗浄し、DMF-酢酸エチルから再結晶化して [31] 20.70 g (収率 20%) を得る。

融点: 188 ~ 190℃

$[\alpha]_D^{20}$: -17.1° (C = 1.0, DMF)

TLC: R_f2 = 0.65、R_f3 = 0.44

元素分析 [C₂₃ H₃₂ O₈ N₅ Cl₃ として]

	C %	H %	N %
計算値	45.07	5.26	11.43
測定値	45.52	5.41	11.52

32) F (5-7); Z (OMe) - Ile - Gln - Leu - NHNH

- 59 -

Troc [32]

[31] 20.70 g にアニソール 11.00 ml、TFA 44.0 ml を加え、0℃ 1 時間攪拌した。TFA を減圧下留去し、残渣を n-ヘキサンで 3 度洗浄した後、乾燥した。これを DMF 200 ml に溶解し、Et₃N 9.48 ml、Z (OMe) - Ile - ONp 14.09 g を加え、室温で 18 時間攪拌した。DMF を減圧下留去し、残渣に 5% クエン酸、酢酸エチルを加えた後、生じた沈殿物を濾取した。5% クエン酸、5% 重曹水、水の順で洗浄し、DMF-酢酸エチルから再結晶化して 17.43 g (収率 79.1%) を得た。

融点: 205 ~ 207℃

$[\alpha]_D^{20}$: -15.3° (C = 0.9, DMF)

TLC: R_f2 = 0.62、R_f3 = 0.32

元素分析 [C₂₉ H₄₃ O₉ N₆ Cl₃ として]

	C %	H %	N %
計算値	47.97	5.97	11.58
測定値	48.16	6.17	11.66

33) F (4-7); Boc - Gln (OBzl) - Ile - Gln - Leu - NHNH Troc [33]

- 60 -

[32] 15.0 g にアニソール 8.99 ml、TFA 35.69 ml を加え、0℃ 1 時間攪拌した。TFA を減圧下留去し、残渣にエーテルを加えた後、生じた沈殿物を濾取し、乾燥した。これを DMF 50 ml に溶解し、Et₃N 5.80 ml、Boc - Glu (OBzl) - OSu 8.99 g を加え、室温で 20 時間攪拌した。DMF を減圧下留去し、残渣に 5% クエン酸、エーテルを加えた後、生じた沈殿物を濾取した。5% クエン酸、5% 重曹水、水の順で洗浄した。DMF-MeOH から再結晶化して 15.89 g (収率 87.1%) を得た。

融点: 223 ~ 225℃

$[\alpha]_D^{18}$: -26.3° (C = 0.6, DMSO)

TLC: R_f2 = 0.59、R_f3 = 0.49

元素分析 [C₃₇ H₅₆ O₁₁ N₇ Cl₃ として]

	C %	H %	N %
計算値	50.43	6.41	11.13
測定値	50.33	6.52	11.63

34) F (4-7); Boc - Glu (OBzl) - Ile - Gln - Leu - NHNH₂ [34]

- 61 -

[33] 9.0 g を DMF 40 ml に溶かし、酢酸 6.81 ml、亜鉛末 6.67 g を加え、室温で 18 時間攪拌した。亜鉛末を濾去後、濾液を減圧濃縮し、残渣に飽和 EDTA 溶液を加えた後、重曹を加えて pH 7 に調節すると沈殿物が生じた。この沈殿物を飽和 EDTA 溶液、水の順で洗浄し、DMF-MeOH から 2 度再結晶化して [34] 5.31 g (収率 73.7%) を得た。

融点: 260℃ 以上で分解

$[\alpha]_D^{18}$: -22.3° (C = 0.6, DMSO)

TLC: R_f2 = 0.84

アミノ酸分析: Glu 2.06 (2)、Ile 1.01 (1)

Leu 1 (1)

元素分析 [C₃₄ H₅₅ O₉ N₇ として]

	C %	H %	N %
計算値	57.85	7.85	13.89
測定値	57.76	8.00	13.64

35) F (4-34); Boc - Glu (OBzl) - Ile - Gln - Leu - Met - His - Asn - Leu - Gly - Lys (Z) - His - Leu - Asn - Ser - Met

- 62 -

— Glu (OBzl) — Arg (Mta) — Val — Glu
(OBzl) — Trp — Leu — Arg (Mta) — Lys(Z)
— Lys (Z) — Leu — Gln — Asp (OBzl) —
Val — His — Aen — Phe — NH₂ [35]

[30] 357.1 mg (0.0794 mM) にアニソール 0.35 ml、TFA 1.4 ml を加え、0℃で90分間攪拌した後、TFA を減圧下留去した。残渣にヘキサンを加え、生じた油状物を傾斜法により分離した後、エーテルを加え、生じた沈澱物を濾取、乾燥して粉末を得た。これにDMF 5 ml、Et₃N 44.3 μl を加えて中和溶液を得た。

[34]	112.1 mg
DMF	1 ml
3.936 N-HCl / DMF 溶液	96.8 μl
亜硝酸イソアミル	25.3 μl
Et ₃ N	79.7 μl

上記試薬を用いて前項3)の方法と同様にして得たアジド溶液に上記の中和溶液を加え、4℃で48時間攪拌した。反応液を冷却下酢酸で中和し、DMF を減圧下留去した。残渣に5%クエン酸水、

- 63 -

測定値 56.47 6.91 14.29
36) P (2-3); Z (OMe) — Val — Ser — OMe [36]
H — Ser — OMe 15.56 g を DMF 80 ml に溶かし、Et₃N 14.0 ml で pH 7 に調節した。この溶液に Z (OMe) — Val — OH 28.13 g を THF 140 ml に溶かした溶液を加えた後、-10℃で DCC 24.76 g を加え3時間、室温で15時間攪拌した。沈澱物を濾去後、溶媒を減圧留去し、析出した結晶を EtOH で濾取した。THF-EtOH から再結晶化して [36] 22.19 g (収率 58.0%) を得た。

融点: 160 ~ 161℃

$[\alpha]_D^{20}$: 9.9° (C = 0.9, DMF)

TLC: Rf2 = 0.63, Rf3 = 0.64

元素分析 [C₁₈H₂₆O₇N₂ として]

	C %	H %	N %
計算値	56.53	6.85	7.33
測定値	56.70	6.96	7.36

37) P (1-3); Z — Ser — Val — Ser — OMe [37]

[36] 7.15 g にアニソール 4.06 ml、TFA 16.24 ml を加え、0℃1時間攪拌した。TFA を

エーテルを加え、生じた沈澱物を濾取し、5%クエン酸水、5%重曹水、水の順で洗浄した。DMF-酢酸エチルで2回再沈澱化して粗製の [35] を得た。これを DMF 5 ml に溶かし、セフアデックス LH-60 のカラム (3.3 × 140 cm) にチャージし、DMF で溶出した。各フラクションは 9 ml ずつ分画し、54 ~ 61 番目のフラクションを集めて減圧乾固した。残渣を酢酸エチルで処理して粉末化して [35] を得た。収量 240.3 mg (収率 59.7%)

融点: 138 ~ 141℃

$[\alpha]_D^{25}$: 4.0° (C = 0.5, DMF)

TLC: Rf2 = 0.43, Rf4 = 0.77

アミノ酸分析: Glu 4.93 (5)、Ile 1.07 (1)、Leu 5.41 (5)、Asp 4.24 (4)、Ser 0.83 (1)、Gly 1.22 (1)、Val 2.04 (2)、Met 1.75 (2)、Phe 1.00 (1)、Lys 3.00 (3)、His 2.92 (3)、Arg 1.94 (2)

元素分析 [C₂₄H₃₄N₅O₅S₄ · 7H₂O として]

	C %	H %	N %
計算値	56.62	6.92	14.28

- 64 -

減圧留去し、残渣を n-ヘキサンで3度洗浄した後、乾燥して油状物を得た。これを DMF 35 ml に溶かし、Et₃N 2.62 ml を加えて中和溶液を得た。

Z — Ser — NHNH ₂	5.68 g
5.55 N-HCl / DMF 溶液	97.0 ml
亜硝酸イソアミル	3.58 ml
DMF	10 ml
Et ₃ N	11.31 ml

上記試薬を用いて前項3)の方法と同様にして得たアジド溶液に上記の中和溶液を加え、4℃で48時間攪拌した。沈澱物を濾去し、濾液を減圧濃縮した後、残渣に EtOH を加えた。生じた沈澱物を濾取し、DMF-MeOH から再結晶化して [37] 4.94 g (収率 60.1%) を得た。

融点: 211 ~ 213℃

$[\alpha]_D^{20}$: 6.4° (C = 0.9, DMF)

TLC: Rf2 = 0.66

元素分析 [C₂₀H₂₉O₈N₃ として]

	C %	H %	N %
計算値	54.66	6.65	9.56

測定値 54.75 6.52 9.45
 38) P (1-3); Z-Ser-Val-Ser-NHNH₂
 [38]
 [37] 327 mg を DMF 20 ml、MeOH 10 ml に
 溶解し、ヒドラジン水和物 1.86 ml を加え一夜放置
 した。析出した結晶を MeOH で濾取し、EtOH で洗
 浄後、DMSO-MeOH から再結晶化して [38]
 2.65 g (収率 81.3%) を得た。

融点: 240 °C

$[\alpha]_D^{25}$: -3.4° (C = 0.6, DMSO)

TLC: R_{f2} = 0.44

アミノ酸分析: Ser 1.83 (2)、Val 1 (1)

元素分析 [C₁₉H₂₉O₂N₅ として]

	C %	H %	N %
計算値	51.92	6.65	15.94
測定値	51.63	6.65	15.98

39) P (1-34); Z-Ser-Val-Ser-Glu
 (OBzl)-Ile-Gln-Leu-Met-His-
 Asn-Leu-Gly-Lys (Z)-His-Leu-
 Asn-Ser-Met-Glu (OBzl)-Arg (Mts)
 -Val-Glu- (OBzl)-Trp-Leu-Arg

- 67 -

酢酸エチルで 5 回再沈殿化して粗製の [39] 1998
 mg を得た。これを DMF 10 ml に溶かし、セフア
 クリル S-200 のカラム (3.4 × 140 cm) にチャ
 ージし、DMF-水 (95:5) の混液で溶出した。
 各フラクションを 10 ml ずつ分画した。各フラク
 ションは 280 nm で追跡し、75~89 番目のフラ
 クションを集め、減圧乾固した。残渣を酢酸エチ
 ルで処理して粉末 141.3 mg を得た。これを DMF
 5 ml に溶かし、上記と同一条件でカラムクロマト
 グラフィーを行つた。76~88 番目のフラクシ
 ョンを集め、減圧乾固した。残渣を酢酸エチルで
 処理して精製した [39] を得た。収量 111.3 mg

融点: 145~148 °C

$[\alpha]_D^{25}$: -3.5° (C = 0.3, DMF)

TLC: R_{f2} = 0.60, R_{f4} = 0.81

アミノ酸分析: Ser 2.78 (3)、Val 3.18 (3)、
 Asp 4.21 (4)、Glu 5.10 (5)、Gly 1.08 (1)、
 Met 1.49 (2)、Ile 1.07 (1)、Leu 5.18 (5)、
 Phe 1.00 (1)、Lys 2.91 (3)、His 2.45 (3)、
 Arg 1.91 (2)

(Mts)-Lys (Z)-Lys (Z)-Leu-Gln-
 Asp (OBzl)-Val-His-Asn-Phe-NH₂
 [39]

[38] 240.3 mg (0.0474 mM) にアニソール (2
 % EDT 含有)、TFA 0.84 ml を加え、0 °C で 90
 分間攪拌した後、TFA を減圧下留去した。残渣
 をヘキサンで洗浄し、エーテルを加え、生じた沈
 殿物を濾取、乾燥して粉末を得た。これに DMF
 5 ml、Et₃N 26.4 μl を加えて中和溶液を得た。

[38] 41.7 mg

DMF 1 ml

3.936 N-HCl/DMF 溶液 57.8 μl

亜硝酸イソアミル 15.1 μl

Et₃N 47.6 μl

上記試薬を用いて前項 3) の方法と同様にして
 得たアジド溶液に上記の中和溶液を加え、4 °C で
 48 時間攪拌した。反応液を冷却下酢酸で中和し、
 DMF を減圧下留去した。残渣に 3% 酢酸水、エ
 ーテルを加え、生じた沈殿物を濾取し、3% 酢酸
 水、5% 重曹水、水の順で洗浄した。DMF-酢

- 68 -

アミノ酸分析 [4M-MSA, 110 °C, 48 時間]
 ; Glu 5.13 (5)、Ile 1.02 (1)、Leu 5.36 (5)、
 Asp 4.40 (4)、Ser 0.94 (3)、Gly 1.22 (1)、Val
 1.90 (3)、Met 1.78 (2)、Phe 1.00 (1)、Trp 0.59
 (1)、Lys 2.96 (3)、His 2.92 (3)、Arg 1.91 (2)

元素分析 [C₂₅₉H₃₆₀N₅₆O₆₂S₄·7H₂O として]

	C %	H %	N %
計算値	56.51	6.85	14.24
測定値	56.55	6.81	13.98

40) h-PTH (1-34) NH₂

[39] 200 mg (0.0372 mM) に m-クレゾール 0.78
 ml を加え、次いで 1 M-TFMSA と 1 M チオアニ
 ソール含有 TFA 溶液 7.44 ml を加え、0 °C で 2 時
 間攪拌した後、ヘキサンを加え、生じた油状物を
 傾斜法により分離した。エーテルを加えて粉末化
 し、すばやく濾取、乾燥した。得られた粉末を冷
 却下水 10 ml に溶かし、これにアンバーライト C
 G-4 B 樹脂 (アセテート型) 約 2 g を加え、30
 分間攪拌した。樹脂を濾去後、濾液を氷冷下 5 N
 アンモニア水で pH を 10.0 に調節した。再び酢酸

酸性とした後、凍結乾燥して粗生物を得た。TLC
; $R_{f5} = 0.48$ (ニンヒドリン反応)、 $R_{f5} = 0.5$
(エーデルリッヒ反応)。これを 1 N 酢酸水 5 ml に溶
かし、セフアデックス G-50 のカラム (2.8 ×
143 cm) にチャージし、1 N 酢酸水でゲル通過し
た。溶出液は 10 ml ずつ分画し、280 nm で追跡
した。36 ~ 57 番目のフラクション F-1 と 58
~ 72 番目のフラクション F-II を凍結乾燥して粉
末 F-I 31.8 mg (収率 18.3%) および粉末 F-II
140.1 mg (収率 80.8%) を得た。

F-II 140 mg を 8 M 尿素含有 0.01 M 酢酸アンモ
ニウム水溶液 (PH 5.1) 5 ml に溶かし、これを
予め 0.01 M 酢酸アンモニウム水溶液 (PH 5.1)
で平衡化した CM-セルロースのカラム (2.4 ×
5 cm) にチャージした。0.01 M 酢酸アンモニウム
水溶液 (PH 5.1) 40 ml で洗浄し、0.01 M 酢酸
アンモニウム水溶液 (PH 5.1) 300 ml と 0.3 M
酢酸アンモニウム水溶液 (PH 5.1) 300 ml の間
で直線濃度勾配をかけて溶出した。溶出液を 5 ml
ずつ分画し、各フラクションを 280 nm で追跡し

- 71 -

溶出液は 10 ml ずつ分画し、各フラクションを 280
nm で追跡し、27 ~ 38 番目のフラクションを集
めて凍結乾燥して白色粉末 38.6 mg (収率 22.3%) を
得た。この粉末をブタノール-ピリジン-酢酸
0.6 M 酢酸アンモニウム水溶液 (5:0.1:11) の
上層液 2 ml に溶かし、セフアデックス G-50 の
カラム (2.4 × 9.4 cm) にチャージし、上記上層
液で溶出した。溶出液は 5.3 ml ずつ分画し、各フ
ラクションを Folin-Lowry 法で発色後、750 nm
の吸光度の測定により追跡した。35 ~ 40 番目
のフラクション F-II-31、41 ~ 49 番目の
フラクション F-II-32 (TLC; $R_{f5} = 0.48$)
および 50 ~ 75 番目のフラクション F-II-33
を得た。F-II-32 のフラクションを集め、減
圧濃縮した後、凍結乾燥を 4 回行つて h-PTH
(1-34) NH₂ を得た。収量 22.8 mg

TLC, $R_{f5} = 0.48$ [α]_D²⁴ = -55.2° (C = 0.2, 0.1 N 酢酸水)

アミノ酸分析; Asp 4.00 (4)、Ser 2.34 (3)、
Glu 4.80 (5)、Gly 1.11 (1)、Val 3.18 (3)、

て 35 ~ 60 番目のフラクション F-II-1、61
~ 85 番目のフラクション F-II-2、86 ~ 115
番目のフラクション F-II-3 および 116 ~ 150
番目のフラクション F-II-4 を得た。各フラク
ションを集めて凍結乾燥し、水酸化アンモニウム
を除くため、水を加え 3 回凍結乾燥して F-II-
1 の粉末 7.5 mg (収率 5.4%)、F-II-2 の粉
末 20.5 mg (収率 14.5%)、F-II-3 の粉末 41.5
mg (収率 29.6%) および F-II-4 の粉末 31.0 mg
(収率 22.1%) を得た。

F-II-3 の粉末を 1 N 酢酸水 3 ml に溶かし、セ
フアデックス G-50 のカラム (2.8 × 9.4 cm)
にチャージし、1 N 酢酸水でゲル通過した。溶出
液を 10 ml ずつ分画し、各フラクションを 280 nm
で追跡し、39 ~ 49 番目のフラクションを集め
て凍結乾燥して粉末 40 mg を得た。

上記粉末を水 5 ml に溶かし、ジチオスレイトー
ル 53 mg を加えて 30 °C で 48 時間還元した。反
応液をセフアデックス G-25 のカラム (1.8 ×
140 cm) にチャージし、1 N 酢酸水で溶出した。

- 72 -

Met 1.25 (2)、Ile 1.23 (1)、Leu 5.20 (5)、
Phe 1.00 (1)、Lys 2.87 (3)、His 2.38 (3)、

Arg 1.89 (2)

アミノ酸分析 [4 M-MSA, 110 °C, 48 時間]

; Asp 4.11 (4)、Ser 2.97 (3)、Glu 4.86 (5)、
Gly 1.07 (1)、Val 3.16 (3)、Met 1.55 (2)、
Ile 1.01 (1)、Leu 5.12 (5)、Phe 1.00 (1)、
Trp 0.64 (1)、Lys 3.20 (3)、His 2.76 (3)、
Arg 2.00 (2)

アミノ酸分析 [シグマ社製、ロイシンアミノペ
プチダーゼ Lot. No. L-6007, 38 °C, 48 時間]
; Asp 0.92 (1)、Asn 2.88 (3)、Ser 2.91 (3)、
Glu 2.93 (3)、Gln 1.91 (2)、Gly 1.03 (1)、
Val 3.11 (3)、Met 1.84 (2)、Ile 0.94 (1)、
Leu 4.95 (5)、Phe 1.00 (1)、Trp 0.78 (1)、
Lys 3.25 (3)、His 2.58 (3)、Arg 1.99 (2)

元素分析 [C₁₈H₂₉N₅O₅S₂ · 9CH₃COOH · 15
H₂O として]

	C %	H %	N %
計算値	48.50	7.32	15.92

- 73 -

- 427 -

- 74 -

測定値 48.55 7.65 15.79

特開昭58- 56052(20)

高速液体クロマトグラフィー

カラム ; μ Bondapak C₁₈ (0.25" \times 1')

緩衝液 ; 0.1%酢酸含有0.1Mリン酸とアセ
トニトリルの30:70~50:50の
直線型濃度勾配

流速 ; 1 ml / 分

検出 ; 280 nm

結果 ; 7.76分に1スポット検出

ディスク等電点電気泳動 (8 M 尿素ゲル , P H
3 ~ 10 , 長さ 0.5 \times 6 cm , 1 mA , 200 V) ;
P H 10.0 より 0.75 cm の位置に1つのバンドのみを
有する。

P T H 活性 ; ラット腎による P T H レセプター
アッセイの結果は 5100U/mg であつて、h - PTH
(1 - 34) (東洋醸造社製 , 3300U/mg) より
1.5 倍の活性を有する。
の

特許出願人
東洋醸造株式会社
代表者 伊 東 富士 馬

- 75 -